

Artículo Original/ Original Article

Fuente de alimentación de ejemplares de *Triatoma sordida* en un área con alto riesgo de domiciliación en el Chaco Paraguayo

*Zunilda Sánchez¹, Graciela Russomando¹, Daysi Pineda¹, Laura Guillén¹, Berta Paredes², Cesia Villalba de Feltes²

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

²SENEPA, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Asunción, Paraguay

Cómo referenciar este artículo/ How to reference this article:

Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Villalba de Feltes C. Fuente de alimentación de ejemplares de *Triatoma sordida* en un área con alto riesgo de domiciliación en el Chaco Paraguayo. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2018; 16(1): 78-83

RESUMEN

En el presente estudio evaluamos indicadores entomológicos (índices de infección, colonización e infección natural) de ejemplares de *Triatoma sordida* capturados en el intra y peridomicilio de viviendas del Chaco Paraguayo en el período 2014 al 2016. El objetivo fue comparar con los hallazgos previamente reportados en el periodo 2010 al 2013 en la misma región. Además se ha incorporado la detección de fuente de alimentación como complemento para definir el riesgo de domiciliación de este vector secundario. Se aplicaron técnicas moleculares asociados a indicadores entomológicos y epidemiológicos a 220 ejemplares de *T. sordida* capturados en 67 viviendas de 24 localidades del Chaco. Se detectó infestación y colonización por *T. sordida* en el intradomicilio 13/67 (19%) y 5/13 (38%) y en el peridomicilio 54/67 (81%) y 43/54 (80%), respectivamente. Se detectó infección con *T. cruzi* en un 17,3% de los ejemplares analizados. La fuente de alimentación pudo detectarse en tan solo 13 de 220 ejemplares (6%), todos resultaron positivos para sangre de gallina y correspondían a captura en el peridomicilio. El índice de infestación intradomiciliar fue del 19%, superior al de años anteriores y similar a las zonas históricamente endémicas de la Región Occidental (18%-20%). El riesgo de transmisión intradomiciliar sigue siendo elevado porque en 3 de 5 viviendas con ninfas de *T. sordida*, los ejemplares estaban infectados con *T. cruzi*. Los indicadores entomológicos obtenidos en el presente estudio concuerdan con resultados previos de nuestro equipo, y confirman la capacidad vectorial de este triatomino secundario en la transmisión de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *T. sordida*, infestación, colonización, infección natural, fuente de alimentación.

Blood meal source of specimens of *Triatoma sordida* in an area with high risk of domiciliation in the Paraguayan Chaco

ABSTRACT

In the present study we evaluated entomological indicators (infection rates, colonization and natural infection) of *Triatoma sordida* specimens captured in the intra and peridomicile of households of the Paraguayan Chaco in the period 2014 to 2016. The objective was to compare with the previously reported findings in the period 2010 to 2013 in the same region. In addition, the detection of the blood meal source has been incorporated as a complement to define the risk of domiciliation of this secondary vector. Molecular techniques associated with entomological and epidemiological indicators were applied to 220 *T. sordida* specimens captured in 67 dwellings in 24 locations in the Chaco. Infestation and

Fecha de recepción: febrero 2018. Fecha de aceptación: marzo 2018

*Autores correspondientes: Sánchez Z y Russomando G. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

Email: zunysanchez@hotmail.com; russomando.graciela@gmail.com

colonization by *T. sordida* was detected in the intradomicile 13/67 (19%) and 5/13 (38%) and in the peridomiciliary 54/67 (81%) and 43/54 (80%), respectively. Infection with *T. cruzi* was detected in 17.3% of the samples analyzed. The blood meal source could be detected in only 13 of 220 specimens (6%), all were positive for chicken blood and corresponded to capture in the peridomicile. The rate of intradomiciliary infestation was 19%, higher than in previous years and similar to the historically endemic areas of the Western Region (18%-20%). The risk of intradomiciliary transmission remains high because in 3 out of 5 dwellings with nymphs of *T. sordida*, the specimens were infected with *T. cruzi*. The entomological indicators obtained in the present study agree with previous results of our team, and confirm the vectorial capacity of this secondary triatomine in the transmission of Chagas disease.

Key words: *T. sordida*, infestation, colonization, natural infection, blood meal source.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* cuyo vector principal en la Región del Cono Sur de América Latina es el *Triatoma infestans*. Esta vía de transmisión ha disminuido notablemente en la última década, gracias a las decisiones políticas y técnicas de los países que con actividades sostenidas de control vectorial han logrado el corte de la transmisión intradomiciliar de *T. cruzi* por esta especie^(1,2). En la actualidad existe un riesgo permanente de re-infestación de las viviendas desde focos residuales de *T. infestans* como también el riesgo de la invasión de viviendas por especies secundarias si no se llevan a cabo acciones de vigilancia entomológica sostenidas en el tiempo y espacio^(2,3). Muchas especies nativas adquieren importancia epidemiológica debido a la capacidad de intercambio entre hábitats selváticos y domésticos, así como por su potencialidad para reemplazar el nicho ecológico de triatomíneos estrictamente domiciliarios. Luego de la disminución de estas especies por las acciones de control y vigilancia vectorial, adquieren importancia epidemiológica las especies secundarias, entre éstas especies se destaca el *T. sordida* considerado como vector secundario en la transmisión de *T. cruzi*^(2,4). El gran Chaco es una eco-región que incluye Argentina, Bolivia y Paraguay donde la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *T. infestans* (vector principal) constituye hasta la fecha un problema de salud pública. El Chaco paraguayo ocupa el 25% de esta región, caracterizada por una baja densidad poblacional y localidades dispersas. Según un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo se ha evidenciado que la especie *T. sordida* posee una capacidad adaptativa en el domicilio y se estima un 87% de riesgo de transmisión de *T. cruzi* intradomiciliar en la Región Occidental⁽²⁾. Existen otros estudios de nuestro grupo realizados sobre la capacidad vectorial de la especie *T. sordida* provenientes de áreas endémicas de la Región Oriental que reportaron en el departamento de Concepción 44% de colonización intradomiciliar y 10,6% de infección natural⁽⁵⁾ y en el departamento de Paraguarí 27% de colonización intradomiciliar y 12,5% de infección natural⁽⁶⁾. En la región del Chaco paraguayo, el control vectorial ha sido limitado por el aislamiento de las viviendas, la persistencia de la infestación doméstica, y las costumbres culturales de los habitantes (tribus indígenas). La detección de infección natural e identificación de la fuente de alimentación de triatomíneos permite conocer sus huéspedes e indagar sobre su comportamiento y riesgo para transmitir *T. cruzi*, razón por la cual se propuso realizar este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y población: Se analizaron 220 ejemplares de *T. sordida* capturados entre 2014 y 2016 en 67 viviendas de 24 localidades distribuidos en 8 distritos de los tres departamentos de la Región Occidental o Chaco. En el departamento de Pte. Hayes los ejemplares fueron capturados en 50 viviendas ubicadas en 18 localidades dispersas en 4 distritos; mientras que en Boquerón y Alto Paraguay, los ejemplares fueron capturados en 5 y 12 viviendas, situadas en 4 y 2 localidades de 2 distritos respectivamente. Fueron registrados los datos epidemiológicos como sitio de captura y estadio de los triatomíneos capturados en las viviendas.

Los ejemplares de *T. sordida* fueron clasificados taxonómicamente según Lent y Wygodzinsky⁽⁷⁾.

Disección de triatominos: Se realizó la disección de cada uno de los 220 ejemplares de *T. sordida* para la posterior extracción de ADN, cada ejemplar disectado fue colocado en tubos que contenían buffer de lisis compuesto por soluciones de Tris pH 7,4, EDTA, NaCl y SDS.

Extracción de ADN: Se realizó la incubación de cada tubo con 5 ul de proteinasa K (20 ug/ml) a 60°C por 60 minutos. La enzima fue inactivada por calentamiento a 95°C por 10 minutos. El ADN fue purificado por el método: fenol-cloroformo descrito por Sambrook et al⁽⁸⁾, se realizó la precipitación con etanol, previa adición de 20 ug de Glucógeno y Acetato de sodio 3M, pH5,4 en un 10% del volumen recuperado. El ADN se resuspendió en 100ul de agua destilada estéril.

Infección natural con *T. cruzi*: La identificación especie específica de *T. cruzi* fue por el método PCR empleando como blanco las secuencias repetitivas de ADN nuclear (microsatélites) de *T. cruzi*, con los cebadores TCZ1 y TCZ2 descrito por Moser et al⁽⁹⁾ y ADN kinetoplastídico con cebadores 121 y 122 descrito por Degrave et al.

Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

Detección de fuente de alimentación: Para la identificación de la fuente de alimento se emplearon los métodos: PCR y RFLP. Se realizó primeramente un PCR que consistió en la amplificación del gen de citocromo b (*Cyt b*), ADN mitocondrial, se utilizaron los cebadores *Cyt b 1* y *Cyt b 2* descrito por Osnaghi et al⁽¹⁰⁾.

Posteriormente se realizó la digestión de los amplificados de *Cyt b* con 2 enzimas de restricción: *Hae III* y *Mwo I* para la determinación de los patrones de alimentación, se emplearon ADN de 4 especies como controles positivos: humano, ave (gallina), marsupial/roedor y perro según protocolo descrito por Chena et al⁽¹¹⁾. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 220 ejemplares de *T. sordida* colectados de 67 viviendas del Chaco Paraguayo en el período 2014-2016. La captura de los ejemplares en cada vivienda corresponde a una actividad realizada dentro de la vigilancia entomológica del SENEPA (MSP y BS), en localidades previamente fumigadas por la presencia de *T. infestans*.

En cuanto al lugar de captura y estadío, se observó que el 91% (201/220) de los ejemplares fueron capturados en el peridomicilio de las viviendas y el 55% (111 de 201) eran ninfas. Tan solo 5 de las 67 viviendas infestadas (7,5%) tenían ejemplares de *T. sordida* en el intradomicilio y en las mismas se encontraron ninfas (colonización) (Tabla 1).

Identificación de *T. cruzi*: Un total de 38 de 220 ejemplares analizados (17,3%) dieron positivo por PCR para *T. cruzi*. En la Figura 1 se puede observar amplificados de ADN de *T. cruzi* con cebadores TCZ1 y TCZ2 con productos de 198pb.

Tabla 1. Distribución de las 67 viviendas infestadas con *T. sordida* según estadío y lugar de captura de los 220 ejemplares analizados.

Viviendas con <i>T. sordida</i>				
Ejemplares de <i>T. sordida</i> Estadío	INTRADOMICILIO	Viviendas Total infestadas	PERIDOMICILIO	Viviendas Total infestadas
NINFAS (*)	10 (53%)	5 (3 con <i>T. sordida</i> infestadas)	111 (55%)	43
ADULTOS	9 (47%)	8	90 (45%)	11
Total	19	13	201	54

(*) La presencia de ninfas en el intradomicilio de las viviendas es un indicador de colonización.

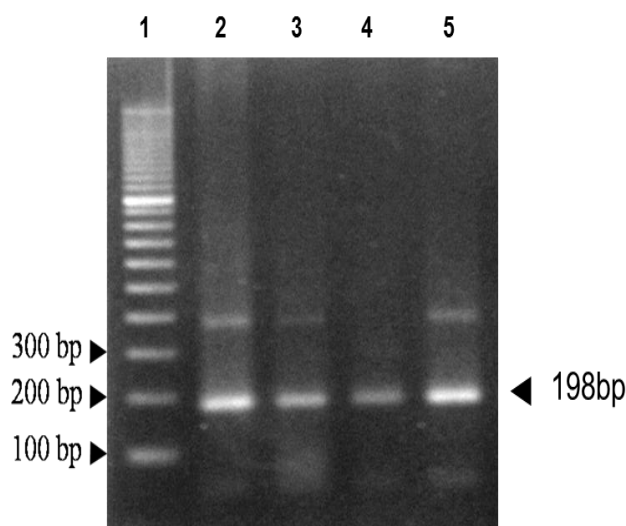


Figura 1. Amplificación de ADN de *T. cruzi* en *T. sordida*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: control positivo de reacción de PCR equivalente a 100 parásitos. Carril 3: control positivo de reacción equivalente a 10 parásitos. Carril 4: muestra de *T. sordida* con *T. cruzi* positivo correspondiente a 10 parásitos. Carril 5: muestra de *T. sordida* con *T. cruzi* positivo correspondiente a 100 parásitos.

Identificación de fuente de alimentación. La amplificación del gen *cyt b* fue posible detectar en 13 ejemplares de los 220 analizados (6%), siendo todos del peridomicilio. En la figura 2 se puede observar los amplificados del gen *cyt b* de los ejemplares de *T. sordida* con un tamaño correspondiente a 358 bp, posteriormente éstos amplificados dieron con las 2 enzimas de restricción un patrón de sangre de gallina como fuente de alimentación. En la figura 3 se pueden observar los patrones de sangre de gallina obtenidos con la enzima *Hae III* con productos de 74, 125 y 159 bp.

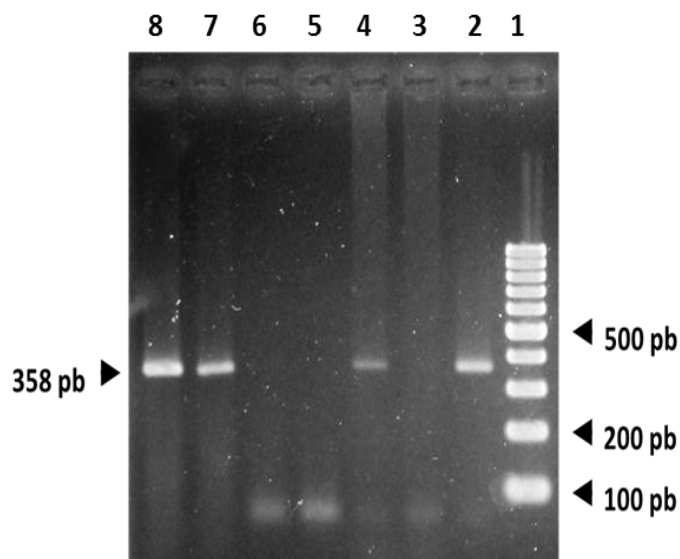


Figura 2. Amplificación del gen *Cyt b* en *T. sordida*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: muestra de *T. sordida*; *cyt b* positiva. Carril 3: control negativo de reacción. Carril 4: muestra de *T. sordida* positiva. Carril 5: control negativo de extracción de ADN. Carril 6: muestra de *T. sordida* sin producto amplificado (negativa). Carril 7: control positivo de ADN de la especie ave (gallina). Carril 8: control positivo de ADN humano.

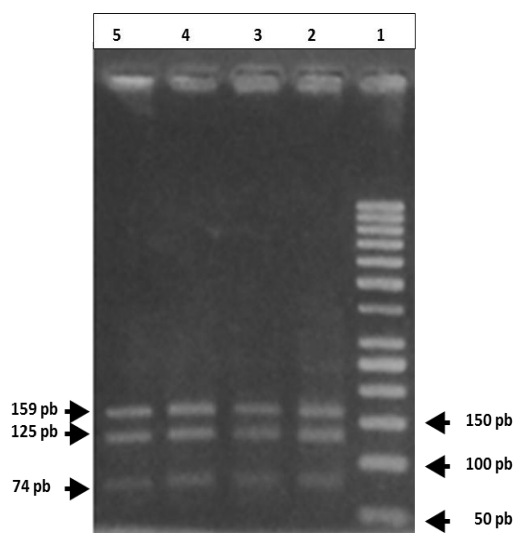


Figura 3. Digestión del gen *Cyt b* con la enzima de restricción *Hae III*. Carril1: Marcador de peso molecular. Carril 2: control positivo patrón de sangre de gallina. Carriles 3, 4, y 5: muestras de *T. sordida* con patrón de sangre de gallina.

DISCUSIÓN

Los índices de colonización intradomiciliar (38%) y de infección natural con *T. cruzi* (17,3%) detectados en este estudio son menores a lo constatado en la publicación de nuestro grupo sobre *T. sordida* del Chaco Paraguayo del 2016, donde se detectaron 52% y 21% respectivamente⁽²⁾, esto tal vez se atribuya al número de viviendas evaluadas. Sin embargo, el riesgo de transmisión intradomiciliar es elevado porque en las 5 viviendas ya se observó colonización de *T. sordida*, y en 3 de ellas se detectaron ejemplares infectados con *T. cruzi*, lo cual debe ser observado porque en las comunidades indígenas del Chaco la población humana infectada supera el 50% y las ninfas deben alimentarse para mudar de estadio. Por otro lado la preferencia de *T. sordida* en el peridomicilio sigue siendo mayor con respecto al domicilio, teniendo en cuenta que de las 67 viviendas infestadas 43 (64%) presentaban como sitio de captura el peridomicilio. Así mismo, la densidad de ejemplares de *T. sordida* en el peridomicilio es mucho mayor que en el domicilio, 201 triatominos en 54 viviendas y 19 triatominos en 13 viviendas respectivamente; lo que evidencia una adaptación aún muy fuerte de *T. sordida* al peridomicilio, como ocurre en regiones de Argentina, incluyendo el Chaco Argentino^(14,15).

La especie *T. sordida* representa un problema epidemiológico en numerosos países del Cono Sur debido a su amplia valencia ecológica, que se manifiesta en su hallazgo en biotopos silvestres, peridomésticos, así como dentro de la vivienda^(12-14,19). Con relación a la infección natural con *T. cruzi*, el índice detectado fue del 17,3%, superior a lo detectado en Argentina por ejemplo, donde se había reportado desde el 2% hasta el 12% de infección natural en ejemplares de *T. sordida* capturados en el peridomicilio^(15,16).

La detección de la fuente de alimentación realizada por el método PCR-RFLPC⁽²⁰⁾ con patrón de sangre de gallina se encontró en un 6% de los ejemplares analizados. La detección de sangre de gallina en el peridomicilio y no de roedores silvestres, reduce el riesgo de infección natural en estos ejemplares. En Brasil ya se habían reportado datos similares en cuanto a hábitos alimenticios de ésta especie de triatomo en regiones de ese país^(18,20). En Paraguay nuestro grupo de trabajo ha realizado varios estudios con *T. sordida* en lo referente a fuente de alimentación por el método PCR-RFLP del gen *cyt b* en ejemplares de la Región Oriental, donde por ejemplo en un estudio sobre un total de 216 ejemplares capturados en el departamento de Concepción, 11 dieron *cyt b* positivos, de los cuales 8 dieron patrón de sangre humana y 1 ejemplar dio sangre de gallina como patrón alimenticio⁽⁵⁾. Otro estudio del mismo grupo reveló que en un total de 247 ejemplares de *T. sordida* procedentes del departamento de Paraguari se detectaron 48 ejemplares *cyt b* positivos, de los cuales 3 dieron patrón de sangre humana y 45 dieron patrón de sangre de marsupial/roedor⁽⁶⁾. Recientemente, en un estudio con *T. sordida* de los departamentos de Paraguari, San Pedro y Cordillera, se detectaron como fuente de alimentación sangre humana en 11%, 10% y 82% respectivamente⁽¹⁷⁾.

Los indicadores entomológicos obtenidos en el presente estudio concuerdan con resultados previos de nuestro equipo, y confirman la capacidad vectorial de este triatomino secundario en la transmisión de la enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Silveira AC, Rojas de Arias A, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H, et al. El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una Iniciativa Internacional. 1991/2001. OPAS, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba; 2002. 316.
- 2- Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Villalba de Feltes C. *Triatoma sordida*: indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. Mem Inst Investig Cienc Salud 2016; 14(3):96-101.
- 3- Noireau F, Gutierrez T, Flores R, Brenier F, Bosseno MF, Wisnivesky- Colli C. Ecogenetics of *T. sordida* and *T. guayasana* (Hemiptera: Reduviidae) in the Bolivian Chaco. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(4): 451-57.
- 4- OPS Organización Panamericana de la Salud. Taller del Cono Sur enfermedad de Chagas. Conceptualización de la vigilancia epidemiológica. Bs. As. Argentina. 2003.
- 5- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other *sylvatic triatomines* in the Bolivian Chaco. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 23-7.
- 6- Sánchez León Z, Russomando G, Guillén R. Enfermedad de Chagas: estudio de un vector secundario. Editorial académica española. 2012.
- 7- Sánchez Z, Chena L, Nara E, Espinola EE, Ferreira E, Paredes B. et al. Alta frecuencia de sangre humana en *Triatoma sordida* (vector secundario de Chagas), infección natural con *Trypanosoma cruzi* y riesgo de domiciliación en viviendas rurales del departamento Paraguarí. IX Congreso Paraguay de Infectología. Asunción-Paraguay. 2013.
- 8- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), and the other significant as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist 1979; 163: 123-27.
- 9- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York E.U.A 1994.
- 10- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; (7): 1477-82.
- 11- Osnaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H. Analysis of mosquito bloodmeals sing RFLP markers. Exp. Parasitol. 2006; 114(4): 259-64
- 12- Chena L, Nara E, Sánchez Z, Espinola E, Russomando G. Estandarización de la técnica PCR-RFLP del gen mitocondrial *cyt b* como herramienta para la identificación de fuentes de alimentación de insectos hematófagos. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol 12 (2). 2014; 33-42
- 13- Noireau F, Breniere F, Ordoñez J, Cardozo L, Morochi W, Gutierrez T, Bosseno MF, García S, Vargas F, Yaksic N, Dujardin JP, Peredo C, Wisnivesky-Colli C. Low probability of transmission of *Trypanosoma cruzi* to humans by domiciliary *Triatoma sordida* in Bolivia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1997; 91, 653-6.
- 14- Breniere SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordoñez J, Gutierrez T, Vargas F, et al. *Trypanosoma* with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. Acta Tropica 71.1998; 269-83.
- 15- Macchiaverna NP, Gaspe MS, Enriquez GF, Tomassone L, Gurtler RE, Cardinal MV. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma sordida* before and after community-wide residual insecticide spraying in the Argentina an Chaco. Acta Tropica 2015; 143, 97-102.
- 16- Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano A, Avalos G, Borda M. Epidemiología de la enfermedad de Chagas, Departamento General Paz, Argentina. Rev Saúde Pública 2003; 37(1):59-64.
- 17- Bar ME, Wisnivesky-Colli C. *Triatoma sordida* Stal 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;(96): 895-9.
- 18- Sánchez Z, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Russomando G. *Triatoma sordida* en viviendas de áreas rurales del Paraguay: Infección natural con *Trypanosoma cruzi* y Fuente de alimentación. XI Congreso Paraguayo de Infectología. Asunción-Paraguay 2017.
- 19- Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silvera AC. Hábitos alimentares: infeccao natural e distribuicao de *triatomíneos* domiciliados na regio central do Brasil. Rev Saúde Públ 1982; 16, 171-204.
- 20- González-Britez N, Vega C, Rolón M, Rojas de Arias A. *Triatomines* and other arthropods in bird nests in native and Mennonite communities of the Paraguayan Chaco. Abstracts of XV Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria, Cartagena-Colombia 2000; (2): 89.
- 21- Mota J, Chacon JC, Gutierrez AF, Sánchez V, Wirtz A, Ordoñez R et al. Identification of blood meal source and Infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas Disease Vectors using a Multiplex Cytochrome b Polimerase Chain Reaction, Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2007; 7(4): 617-27.